Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)
Arbeit unter der Leitung von Dr. A.E. Metzler

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIGENEN BEZIEHUNG ZWISCHEN DEN BOVINEN HERPESVIREN 1 UND 4 SOWIE DEM CAPRINEN HERPESVIRUS 1

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Erika Sanvittore
Tierärztin
von
Zürich und Vitznau

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. H.U. Bertschinger, Korreferent

Zürich 1986

Schellenberg Druck AG, Pfäffikon ZH

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507201_0020

Meinem lieben Sohn Sandro

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 3

2.1. Zellen 3
2.2. Virusstämme 3
2.3. Seren und Antikörpernachweis (Standardmethoden) 4
2.4. ELISA 5
2.4.1. Virus- und Kontrollantigenproduktion 5
2.4.2. Durchführung des ELISA 7
2.4.3. ELISA mit absorbierten Seren 8
2.5. Radioimmunpräzipitation (RIP) 9
2.5.1. Antigenproduktion 9
2.5.2. Durchführung der Radioimmunpräzipitation 11
2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 12

3. ERGEBNISSE 13

3.1. Antikörpernachweis mithilfe der Standardmethoden 13
3.2. Vergleich der Reaktionen der 24 Seren im ELISA mit BHV-1, BHV-4 und CapHV-1 13
3.3. ELISA mit absorbierten Seren 18
3.4. Radioimmunpräzipitation (RIP) 22

4. DISKUSSION 30

5. ZUSAMMENFASSUNG 33

6. LITERATURVERZEICHNIS 34

7. VERDANKUNGEN 38

8. LEBENSLAUF 49

1. EINLEITUNG

Die Infektiöse Bovine Rhinotracheitis/Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis (IBR/IPV) wird durch das Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) verursacht. Die Infektion wird in der Schweiz aufgrund des Bundesratsbeschlusses vom 7. Juli 1982 durch Ausmerzung serologisch positiver Tiere bekämpft. Für den routinemässigen Antikörpernachweis in Blut und Milch wird ein ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) verwendet (2,21). Bei fraglichen Befunden werden Blutproben im Serumneutralisationstest (SNT) zusätzlich untersucht.

Voraussetzung für eine erfolgreiche und rationelle Bekämpfung der IBR/IPV ist die Verfügbarkeit serologischer Methoden mit grösstmöglicher Sensitivität, d.h. es müssen alle akut und latent infizierten Tiere als solche erkannt werden. Andererseits soll das Verfahren spezifisch genug sein, um nur BHV-1 positive Tiere zu erfassen, denn neben der IBR/IPV finden sich beim Rind weitere Herpesvirus-infektionen (6,8). Obwohl die einzelnen Gruppen von Herpesviren serologisch unterscheidbar sind (8), können antigene Gemeinsamkeiten nicht ausgeschlossen werden.

Beim Rind haben die Erreger der Aujeszky'schen Krankheit (Suid Herpesvirus 1, SHV-1) und des Afrikanischen Bösartigen Katarrhalfiebers (Alcelaphines Herpesvirus 1, BHV-3) in unserem Land keine praktische Bedeutung. Indessen kommen Infektionen mit BHV-2 (Bovine Herpes-Mamillitis) (5,15) und BHV-4 (A.E. Metzler, Zürich, persönliche Mitteilung) bei uns vor. Soweit bekannt, weisen BHV-1 und BHV-2 einerseits (16,19) sowie BHV-1 und BHV-4 andererseits (13,17,20) keine antigenen Gemeinsamkeiten auf. Im Hinblick auf die in unserem Lande geltenden Bestimmungen über die IBR/IPV-Bekämpfung überraschte ein Bericht von Mohanty et al. (14), wonach BHV-1 und BHV-4 im ELISA deutlich kreuzreagieren.

Die vorliegende Arbeit sollte darüber Aufschluss geben, ob die Spezifität des praktizierten IBR-ELISA durch BHV-4-positive Reagenten eine Beeinträchtigung erfährt; dies vor allem, weil BHV-4 ätiologisch nicht mit einer bestimmten Krankheit in Zusammenhang zu bringen ist (6,8). Mit zusätzlichen Testmethoden sollten darüber hinaus Hinweise auf das Ausmass der möglichen Antigen-Gemeinsamkeit von BHV-1 und BHV-4 erarbeitet werden. Zum Vergleich der Antigen-Verwandtschaft mit BHV-1 wurde das CapHV-1 (Caprines Herpesvirus 1) herangezogen. Diese beiden Viren stehen untereinander in einer nicht-reziproken immunologischen Beziehung, indem Seren mit Antikörpern gegen BHV-1 im Kreuzneutralisationstest CapHV-1 besser zu neutralisieren vermögen als umgekehrt (4,8,11). Die antigene Kreuzreaktion zwischen BHV-1 und CapHV-1 ist, im Gegensatz zu BHV-4, auch fluoreszenzserologisch gesichert (4). Es ist von epidemiologischer Bedeutung zu wissen, dass Rinder für das CapHV-1 nicht empfänglich zu sein scheinen (1).

Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Spezifität des IBR/IPV-ELISA trotz der Präsenz von BHV-4 in der schweizerischen Rinderpopulation gewährleistet ist. Es ergaben sich jedoch bei zusätzlichen Abklärungen Hinweise auf das Bestehen einer geringgradigen Antigenverwandtschaft zwischen BHV-1 und BHV-4. Im Vergleich hierzu manifestierte sich zwischen BHV-1 und CapHV-1 eine ausgeprägte antigene Wechselwirkung.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zellen

Für die Virusvermehrung wurde die MDBK-Zellinie (Madin Darby Bovine Kidney) verwendet. Als Wachstumsmedium diente Eagle's minimal essential medium (E'MEM, Amimed, Basel, CH), dem 10% inaktiviertes fetales Kälberserum (Nabi, Florida, USA), 100 I.E. Penicillin/ml (Höchst AG, Frankfurt, BRD) und 100 µg Streptomycin/ml (Protochemie AG, Mitlödi, CH) zugegeben wurde. Beim Erhaltungsmedium war der Serumzusatz auf 2% reduziert. Die Zellpassagen erfolgten nach zweimaligem Waschen mit PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) und nach Ablösen der Zellen mit Trypsin und Titriplex^{R}III (EDTA, Merck AG, Darmstadt, BRD).

2.2. Virusstämme

BHV-1, Stamm Jura (R3176/78) wurde 1978 in der Schweiz von einem Rind isoliert, das an einer akuten Infektion des Respirationstraktes erkrankt war (11,18).
BHV-4, Stamm LVR-140 wurde uns freundlicherweise von G. Wellemans, Institut National de Recherches Vétérinaires, Bruxelles zur Verfügung gestellt (24).
CapHV-1, Stamm E.CH wurde 1979 in der Schweiz aus einem Organpool eines Zickleins isoliert, das im Alter von ungefähr einer Woche an einer ulzerativen Darm- und Harnblasenentzündung gestorben war (23).
Alle Isolate waren zweimal auf MDBK-Zellen plaquegereinigt worden. Die Titer der Virusstocks betrugen $\geq 10^7$ $TCID_{50}$/ml (50% tissue culture infectious dose/ml).

2.3. Seren und Antikörpernachweis (Standardmethoden)

Aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen beschränkte man sich für die vorliegende Arbeit auf 23 Rinderseren und 1 Ziegenserum (Tab. 1)*. Dabei wurde die Möglichkeit berücksichtigt, dass ein Rind sowohl eine Infektion mit BHV-1 als auch mit BHV-4 durchgemacht hatte. Entsprechend wurden die Seren nach folgenden Kriterien ausgewählt: vier Seren sollten negativ sein bezüglich BHV-1, BHV-4 sowie CapHV-1; einige Seren sollten nur positiv sein bezüglich BHV-1 respektive CapHV-1 (wegen der bekannten antigenen Kreuzreaktion) aber negativ gegen BHV-4. Weitere Seren sollten Antikörper gegen alle drei Viren aufweisen und schliesslich sollten einige Seren nur BHV-4-positiv sein.

Die Seren Nr. 5 bis 9 stammten von vier experimentell mit BHV-1 infizierten Rindern. Die Blutproben Nr. 5 bis 8 waren ca. 3 Monate post infectionem entnommen worden. Die Titer der virusneutralisierenden Antikörper variierten zwischen 1:23 und 1:91. Serum Nr. 9 stammte ebenfalls von einem dieser vier Rinder, aber nach der Virus-Reaktivierung mit Cortison, was zu einem Titeranstieg der neutralisierenden Antikörper geführt hatte (1:2000).

Serum Nr. 13 stammte von einer experimentell mit CapHV-1-infizierten, tragenden Ziege, welche nach einer fieberhaften Reaktion abortiert hatte (23).

* Zur Erleichterung des Vergleiches der Versuchsergebnisse ist die Tab.1 am Schluss der Arbeit als ausklappbare Kopie zusätzlich beigefügt.

Die drei Seren Nr. 14 bis 16 wurden uns freundlicherweise von G. Wellemans, Bruxelles zur Verfügung gestellt. Serum Nr. 14 wurde von einem Rinderfoeten gewonnen, der intrauterin mit BHV-4 (Stamm LVR-140) infiziert worden war. Die Seren Nr. 15 und 16 stammten von zwei Kühen, die mit inaktiviertem BHV-4 (LVR-140) unter Zugabe von Freund'schem komplettem Adjuvans immunisiert worden waren.

Die übrigen 15 Seren stammten aus dem diagnostischen Material des Instituts.

Die ausgewählten Seren wurden mit den im Institut routinemässig angewandten Standardmethoden erneut auf Antikörper gegenüber BHV-1 (ELISA) und BHV-4 (Immunfluoreszenz) untersucht (Tab. 1). Der ELISA wurde auf vorbeschichteten Testplatten (Trachitest^{R}, Labor Dr. W. Bommeli, Bern, CH) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die Immunfluoreszenz kam die Methode nach Potgieter und Maré (17) zur Anwendung mit der Ausnahme, dass zur Zellfixation statt Azeton, Methanol eingesetzt wurde. Bei fraglichen ELISA-Befunden (BHV-1) wurde zusätzlich ein SNT mit BHV-1 durchgeführt (11).

2.4. ELISA

2.4.1. Virus- und Kontrollantigenproduktion

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden ELISA-Antigene mit allen drei Virusstämmen auf dieselbe Art hergestellt, wobei die langsame Replikation von BHV-4 zu berücksichtigen war. Damit sowohl intrazellulär lokalisierte Antigene (Struktur- und Nicht-Strukturproteine) als auch extrazelluläres Virus (vorwiegend Virionproteine) erhalten blieben, wurde auf eine Virusreinigung verzichtet.

Praekonfluente MDBK-Monolayer (9×10^6 Zellen/150 cm^2) inokulierte man nach zweimaligem Waschen mit PBS mit einer Multiplizität (Virusdosis pro Zelle) von 5-15 $TCID_{50}$. Die Virusadsorption dauerte zwei Stunden bei 37°C. Danach wurde das Inokulum durch 37 ml Erhaltungsmedium ersetzt. Wenn der zytopathische Effekt (CPE) 80-90% erreichte, was 24 Stunden nach der Inokulation der Fall war, erfolgte die Virusernte aus Ueberstand und Zellen. Hierzu wurde der Kulturüberstand bei 4'800 x g während 15 Minuten geklärt und bei 17'000 rpm (Sorvall^R Ultracentrifuge OTD-50B, Du Pont Company, Instrumental Products, Newtown, Connecticut, USA) während 1 1/2 Stunden im SW-28-Rotor zentrifugiert, um das Virusmaterial zu pelletieren. Die noch haftenden Zellen in den Kulturflaschen wurden nach Zugabe von 14 ml Erhaltungsmedium dreimal eingefroren und aufgetaut. Grössere Zellbestandteile wurden bei 4'800 x g während 15 Minuten sedimentiert. Der resultierende Ueberstand wurde wie oben ultrazentrifugiert (SW-40-Rotor). Die Pellets aus jeweils drei Gewebekulturflaschen nahm man in 5 ml PBS auf und resuspendierte sie über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Antigenpräparationen portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Dieses Prozedere fand Anwendung für die Antigenherstellung von BHV-1 und CapHV-1.

Für BHV-4 war das Vorgehen mit folgenden Ausnahmen analog: nach der Virusadsorptionsperiode wurde das Inokulum auf den Zellen belassen und es wurden 30 ml Erhaltungsmedium pro Kulturflasche zugegeben. 72 Stunden post inoculationem war der CPE auch hier so weit fortgeschritten, dass das Antigen auf die gleiche Weise wie bei BHV-1 und CapHV-1 geerntet werden konnte.

Als Kontrollantigen dienten MDBK-Zellen, die anstelle von Virus nur mit Erhaltungsmedium inokuliert worden waren (Mockinfektion), nach entsprechender Aufarbeitung.

2.4.2. Durchführung des ELISA

Die optimale Antigenverdünnung wurde durch Titration, unter Verwendung von 1:40 verdünnten positiven und negativen Referenzseren ermittelt. Für die Antigentitrationen und den Antikörpernachweis verwendete man Mikro-ELISA-Platten (M 129 A, Dynatech Produkte AG, Kloten, CH).

Für BHV-1 und CapHV-1 wurde eine optimale Antigenverdünnung von 1:128 ermittelt, für BHV-4 eine solche von 1:32. Das Kontrollantigen wurde entsprechend den jeweiligen Virusverdünnungen eingesetzt. Die Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Kammer.

Bei der Antigenbeschichtung ging man so vor, dass die einzelnen Virusantigene, zusammen mit dem Kontrollantigen, auf separaten Platten eingefüllt wurden (BHV-1-ELISA, BHV-4-ELISA und CapHV-1-ELISA). Von den mit Adsorptionspuffer (1,59 g Na_2CO_3; 2,93 g $NaHCO_3$ ad 1000 ml Aqua bidest., pH 9,8) verdünnten Antigenen beschickte man die Dellen der Mikrotiterplatten mit jeweils 0,1 ml und adsorbierte während einer Stunde. Anschliessend wurden die Platten zwecks Entfernung nicht gebundener Antigene einmal kurz und dreimal 5 Minuten mit PBS-Tween (PBS enthaltend 0,05% Tween 20, Dr. Bender & Hobein AG, Zürich, CH) gewaschen. Die zu testenden Seren wurden nach Verdünnung mit PBS-Tween (1:40) in die Antigen-beschichteten ELISA-Platten eingefüllt (0,1 ml/Delle). Dabei wurden für jedes Serum je 2 Dellen mit Virus- und Kontrollantigen eingesetzt. Nach einer Bindungszeit von 1 Stunde wurde wie oben beschrieben 4 x gewaschen.

Für die Seren 1 bis 12 und 14 bis 24 (Rinderseren) wurde das Antispeziesglobulin-Konjugat (RAB-IgG [F_{ab}+F_c]-Peroxidase: Labor Dr. W. Bommeli, Bern, CH) in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-Tween verwendet. Für das Ziegenserum 13 setzte man das Antiziegenglobulin-Konjugat (RAG-IgG [F_{ab}+F_c]-Peroxidase: Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, NL) in der als geeignet befundenen Verdünnung von 1:10'000 ein. Pro Delle wurde 0,1 ml Konjugatlösung eingefüllt und eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang wurden 0,2 ml Substrat-Indikatorlösung (2) pro Delle zugefügt und nochmals 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Extinktionen photometrisch bei 405 nm gemessen (Titertek^R, Multiscan, Flow Laboratories, Baar, CH) und für jedes Serum der Mittelwert der Nettoextinktionen (NE) errechnet: NE = 0,5 x [(Extinktion Virusantigen 1 + Extinktion Virusantigen 2) - (Extinktion Kontrollantigen 1 + Extinktion Kontrollantigen 2)].

2.4.3. ELISA mit absorbierten Seren

Diese Experimente wurden mit den Seren Nr. 5, 14, 15 und 16 durchgeführt. Als Antigen für die Absorption dienten mit BHV-1, BHV-4, respektive CapHV-1 infizierte MDBK-Zellen, sowie eine mock-infizierte Zellkontrolle. Als weitere Kontrolle wurde von allen 4 Seren eine entsprechende Menge ohne Behandlung bei 4°C belassen.

Praekonfluente MDBK-Monolayer ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ 25 cm^2) inokulierten wir nach zweimaligem Waschen mit PBS mit einer Multiplizität von 5 $TCID_{50}$. Nach der Virusadsorptionsphase von 1 1/2 Stunden wurde das Inokulum durch je 4 ml Erhaltungsmedium ersetzt und weiter inkubiert. Bei fortgeschrittenem CPE wurden die Kulturen

zweimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Fixation der Zellen mit je 5 ml Methanol bei -20°C während 10 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde je 25 cm^2 0,65 ml verdünntes Serum (1:20 in PBS) auf die fixierten Zellen gegeben und während zwei Stunden bei 37°C absorbiert. Anschliessend gewann man die Seren wieder und zentrifugierte sie kurz, um gröbere Bestandteile zu sedimentieren. Diese Seren, sowie die nicht behandelten, bei 4°C gehaltenen Serumproben, wurden mit PBS-Tween zusätzlich 1:2 verdünnt und wie unter 2.4.2. beschrieben einem ELISA unterzogen. Als ELISA-Antigen wurden einerseits das BHV-1-Standardantigen (vorbeschichtete Testplatten: Trachitest^R, Labor Dr. W. Bommeli, Bern, CH) und andererseits der BHV-4-ELISA verwendet.

2.5. Radioimmunpräzipitation (RIP)

2.5.1. Antigenproduktion

Die RIP mit den 24 Seren wurde in drei Etappen mit jeweils 8 Seren durchgeführt. Die hierfür benötigten radioaktiv markierten Proteine wurden in Gewebekulturflaschen à 1,5 x 10^6 Zellen/25 cm^2 hergestellt (metabolische Markierung mit [^{35}S]Methionin). Für BHV-1, CapHV-1 und die Zellkontrolle wurde je eine Kulturflasche eingesetzt. Aufgrund der Erfahrungen in den Vorversuchen war es nötig, für BHV-4 die doppelte Zellzahl zu infizieren, um ausreichende Mengen markierter Antigene zu erhalten.

Praekonfluente MDBK-Monolayer wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS mit einer Multiplizität von 5-10 $TCID_{50}$ inokuliert. Die Virusadsorption erfolgte bei 37°C während zwei Stunden. Nach Entfernung des Inokulums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschliessend gab man zu

jeder Kultur 4 ml Markiermedium (90% (v/v) E'MEM ohne Methionin und 10% (v/v) Erhaltungsmedium) und bebrütete nochmals 5 Stunden bei 37°C im CO_2-Schrank. Hierauf wurden 5-10 µCi/ml [^{35}S]Methionin (New England Nuclear, Zürich, CH; spezifische Aktivität: 1125 Ci/mMol) zugefügt und die Inkubation bei 37°C im CO_2-Schrank fortgesetzt. Sobald die Zellen einen fortgeschrittenen CPE zeigten, was nach ca. 24 Stunden der Fall war, wurden sie nach zweimaligem Waschen mit PBS mit Hilfe eines Magnetstabes von der Unterlage gelöst und in 10 ml PBS aufgenommen. Es folgte eine Zentrifugation bei 1'500 x g während 10 Minuten. Der Ueberstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 1 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100) gelöst und während 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Zell-Lysate wurden anschliessend 5 Sekunden bei kontinuierlicher Energieabgabe beschallt (Sonifier^R cell disruptor B-30, Branson, Heusenstamm, BRD). Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 100'000 x g während 1 1/2 Stunden, um nicht solubilisierte Bestandteile zu entfernen. Nach Beendigung dieses Arbeitsschrittes wurde der Ueberstand sofort geerntet. Davon entnahm man 5 µl und bestimmte die Radioaktivität unter Verwendung eines Szintillationsvermittlers (Emulsifier 299, Packard Instrument Company, Inc., Illinois, USA) in einem Liquid Scintillation Counter (Kontron AG, Zürich, CH). Die Radioaktivitätsmessung wurde durchgeführt, um einen Anhaltspunkt über den Umfang des Einbaus von [^{35}S]Methionin zu erhalten.

Das beschriebene Vorgehen wurde für BHV-1, CapHV-1 sowie die mock-infizierte Zellkontrolle angewendet. Bei BHV-4 war das Prozedere mit folgenden Ausnahmen analog. Die Zellen wurden am Tag der Aussaat inokuliert, da die Virusreplikation unter dieser Voraussetzung erfahrungsgemäss effizienter verläuft. Nach der Adsorption wurde das Inokulum auf den Zellen belassen, 4 ml Erhaltungsmedium zugegeben und die Inkubation bei 37°C fortgesetzt. Am folgenden Tag, d.h. zur gleichen Zeit wie bei BHV-1, CapHV-1 und bei der mock-infizierten Zellkontrolle wusch man die Zellen zweimal mit PBS, gab das Markiermedium zu und bebrütete weitere 5 Stunden. Hierauf folgten die Zugabe von [^{35}S]Methionin zum Markiermedium und Weiterbebrütung. Durch das beschriebene Vorgehen war es möglich, die 3 Virusantigene und das Kontrollantigen anderntags gleichzeitig aufzuarbeiten.

2.5.2. Durchführung der Radioimmunpräzipitation

Massgebend für die eingesetzte Antigenmenge war die gemessene Radioaktivität: je Serum setzte man 120'000 cpm (counts per minute) ein. Dies entsprach dem aus 0,5 x 10^5 bis 2 x 10^5 Zellen solubilisierten Antigen. Das für die einzelnen Seren benötigte Antigenvolumen ergänzte man mit Lysispuffer auf 225 µl und fügte 25 µl verdünntes Serum (1:5 in Lysispuffer) zu. Die Antikörper liess man über Nacht bei 4°C binden. Danach wurden 10 mg Protein A-Sepharose^R CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, S) zugesetzt, die man vorher mindestens 15 Minuten in PBS hatte quellen lassen und die anschliessend zweimal mit PBS sowie zweimal mit Lysispuffer gewaschen worden waren. Für den Bindungsprozess der F_c-Fragmente der Antikörper an das Protein A wurde das Gemisch bei Raumtemperatur während 45 Minuten inkubiert. Von Zeit zu

Zeit wurde gekippt, um eine bessere Durchmischung zu erreichen. Dann wurde fünfmal mit Lysispuffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Zu den Protein A-Sepharose-Pellets wurden nun zwecks Solubilisation der Immunkomplexe 65 µl SDS-PAGE sample buffer (62,5 mM Tris, 15% (v/v) Glyzerin, 3% (v/v) Sodiumdodecylsulfat, 1% (v/v) Mercaptoaethanol, 0,015% (v/v) Bromphenolblau) gegeben, gut durchmischt und anschliessend 3 Minuten gekocht. Die resultierenden Proteingemische wurden hierauf gelelektrophoretisch aufgetrennt und fluorographisch ausgewertet.

2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE führte man wie beschrieben (10) mithilfe eines diskontinuierlichen Puffersystems in einer LKB-Apparatur durch (Vertical Electrophoresis Unit 2001, LKB, Luzern, CH). Die Gele goss man am Vortag, um eine vollständige Polymerisation zu erreichen. Es wurde bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel elektrophoretisiert. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand bis auf 1 cm erreicht hatte, was etwa 5 Stunden dauerte. Die Gele fixierte man dann während 30 Minuten in einem Gemisch von Methanol, Essigsäure und destilliertem Wasser (6:3:1) und behandelte dann eine Stunde mit En^{3}Hance (New England Nuclear, Zürich, CH). Nach 30-minütigem Wässern unter fliessendem Wasser wurden die Gele in einem Vakuumtrockner (Bio Rad, Glattbrugg, CH) getrocknet. Für die anschliessende Fluorographie (3 Tage bei -70°C) verwendeten wir Kodak XAR-5-Filme (Eastman Kodak, Lausanne, CH).

Bei BHV-1 und BHV-4 erfolgte die Bezeichnung der Proteine nach früheren Arbeiten (10,12). Die vorläufige Nomenklatur der CapHV-1-Proteine lehnte sich an jene von BHV-1.

3. ERGEBNISSE

3.1. Antikörpernachweis mithilfe der Standardmethoden

Die 24 ausgewählten Seren (23 Rinderseren und 1 Ziegenserum) wurden mit der jeweiligen Standardmethode auf Antikörper gegen BHV-1 (ELISA) und BHV-4 (IFT) untersucht (Tab. 1). Die vier Seren Nr. 1, 2, 3 und 4 waren negativ sowohl gegenüber BHV-1 als auch gegenüber BHV-4. Die Seren Nr. 5 bis 10 und 12 ergaben einen positiven BHV-1-Befund, waren jedoch negativ bezüglich BHV-4. Das Ziegenserum Nr. 13, im Standardtest mit dem anti-Rinder-Globulin-Konjugat evaluiert, zeigte ebenfalls einen BHV-1-positiven und einen BHV-4-negativen Befund. Von den 12 Seren mit BHV-4-positivem Untersuchungsergebnis (IFT) erwiesen sich deren 10 (darunter mehrere mit starker BHV-4-Reaktion) in der IBR-Diagnostik als negativ. Bei den zwei Seren Nr. 11 und 15, die mit BHV-1 und BHV-4 reagierten, blieb vorerst unklar, ob die entsprechenden Blutproben von Tieren stammten, die sowohl mit BHV-1 als auch mit BHV-4 infiziert waren. Es konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass nur gerade diese 2 Seren kreuzreagierende Antikörper aufwiesen.

3.2. Vergleich der Reaktionen der 24 Seren im ELISA mit BHV-1, BHV-4 und CapHV-1

Da ein objektivierbarer Antigenvergleich nur in analogen Testsystemen zulässig erschien, wurden die Seren in ELISA's geprüft, in denen vergleichbare Antigenpräparationen von BHV-1 (BHV-1-ELISA), BHV-4 (BHV-4-ELISA) und CapHV-1 (CapHV-1-ELISA) eingesetzt wurden (Abb. 1). Die Beurteilung der serologischen Befunde in den einzelnen ELISA's erfolgte anhand eines errechneten Nettoextinktionswertes.

Tabelle 1 Ergebnisse der serologischen Untersuchung auf BHV-1 und BHV-4 bei den 24 ausgewählten Seren (23 Rinderseren und 1 Ziegenserum). Die Seren wurden mithilfe der jeweiligen Standardmethode (ELISA für BHV-1, indirekte Immunfluoreszenz für BHV-4) evaluiert.

Serum Nr.		BHV-1 ELISA[a]		BHV-4 ind. Immunfluoreszenz	
1		0		-	
2		0		-	
3		0		-	
4		0		-	
5[b]	(BHV-1)	0,829	*	-	
6[b]	(BHV-1)	0,627	*	-	
7[b]	(BHV-1)	0,261	*	-	
8[b]	(BHV-1)	0,641	*	-	
9[b]	(BHV-1)	1,525	*	-	
10		0,182	*	-	
11		0,767	*	+	*
12		0,127	*	-	
13[b]	(CapHV-1)	0,077	*	-	
14[b]	(BHV-4)	0		+++	*
15[b]	(BHV-4)	0,411	*	++	*
16[b]	(BHV-4)	0		++	*
17		0		++	*
18		0,009		++	*
19		0,010		+	*
20		0		+	*
21		0,009		+	*
22		0,010		+	*
23		0,006		+	*
24		0,007		+	*

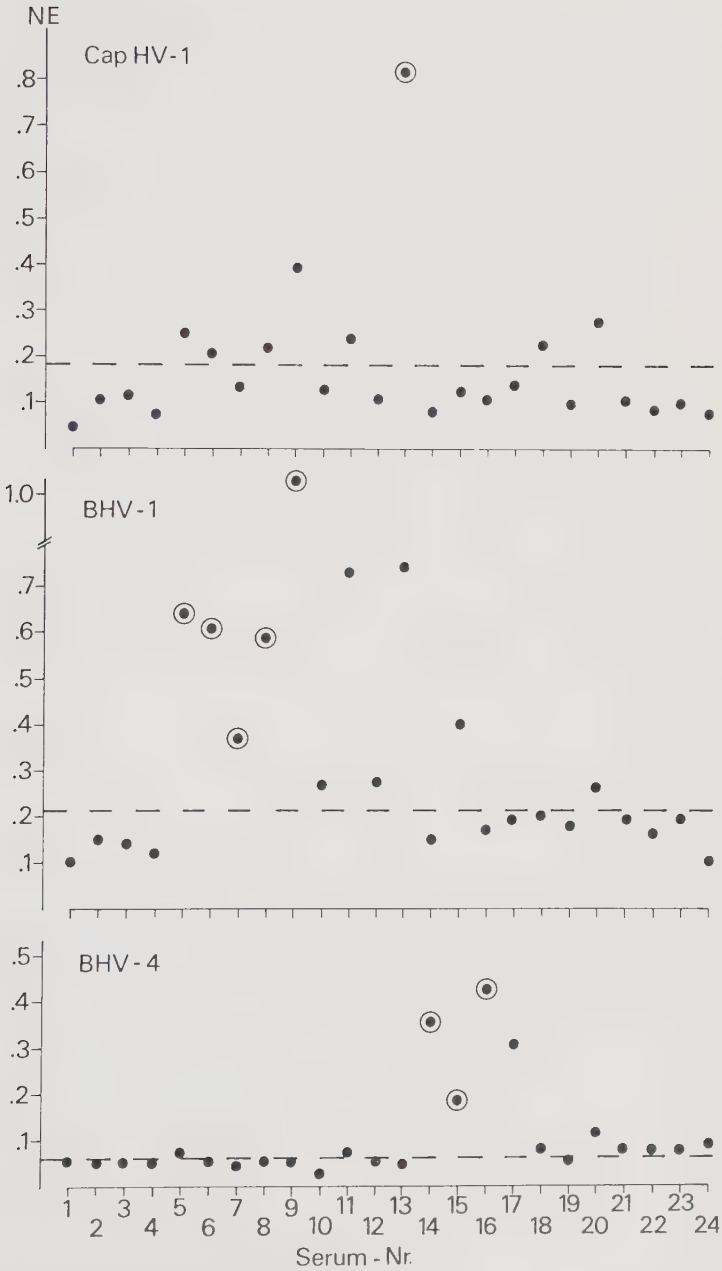
[a] Nettoextinktionswerte, vgl. Material und Methoden
[b] Die Seren Nr. 5-9 stammen von experimentell mit BHV-1 infizierten Rindern, die Seren Nr. 14-16 von mit BHV-4 immunisierten Tieren und Serum Nr. 13 von einer mit CapHV-1 infizierten Ziege
* positive Befunde

Dieser ergab sich aus dem Mittelwert $\bar{x}$ plus der Standardabweichung s der Nettoextinktionen derjenigen Seren, die mit der Standardmethode (Tab.1) als negativ beurteilt worden waren. Werte, die grösser als $\bar{x}$ + s ausfielen, wurden positiv beurteilt. Die vier negativen Kontrollseren Nr. 1 bis 4 waren in allen drei Tests negativ, ein Hinweis auf die Spezifität der einzelnen Reaktionen.

Im BHV-1-ELISA wurde festgestellt, dass die im Standardtest mit BHV-1 positiv befundenen Seren (Nr. 5-13 und 15) ebenfalls positiv reagierten. Zusätzlich fand sich hier jedoch ein weiteres positiv zu beurteilendes Serum (Nr. 20). Die übrigen Proben erwiesen sich in Uebereinstimmung mit der Standardmethode als negativ.

Verglich man die im BHV-1-ELISA erzielten Ergebnisse mit jenen beim CapHV-1-ELISA, fiel auf, dass die BHV-1 positiven Seren mit Antigen von CapHV-1 weniger stark, teilweise auch negativ reagierten (heterologes Antigen). Einzig das Ziegenserum Nr. 13 reagierte hier stärker als im ELISA mit BHV-1. Dies erscheint klar, wenn man bedenkt, dass dieses Serum spezifisch für CapHV-1 (Stamm E.CH) ist und mit einem Spezies-spezifischen Konjugat getestet wurde. Serum Nr. 20 reagierte erneut positiv (wie mit BHV-1-Antigen) und ein weiteres Serum (Nr. 18) war mit CapHV-1-Antigen ebenfalls positiv zu beurteilen. Die mit den Seren Nr. 5-9 und 13-16 im BHV-1-ELISA, sowie im CapHV-1-ELISA erzielten Ergebnisse (in Abb. 1 speziell hervorgehoben) veranschaulichen die bestehende Antigen-Verwandtschaft zwischen BHV-1 und CapHV-1.

Abb. 1: Gegenüberstellung der ELISA-Befunde bei den Seren Nr. 1-24 mit den Antigenen CapHV-1, BHV-1 und BHV-4.
⊙ bezeichnet die von den experimentell immunisierten Tieren stammenden Seren (Tab. 1) nach Evaluation im homologen ELISA.
Die gestrichelte Linie entspricht dem errechneten Grenzwert für die Beurteilung der Befunde (vgl. Text).
NE: Nettoextinktionswerte


NE
Cap HV-1
.8
.7
.6
.5
.4
.3
.2
.1
1.0
BHV-1
.7
.6
.5
.4
.3
.2
.1
BHV-4
.5
.4
.3
.2
.1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
Serum-Nr.

Bei der Evaluation der 24 Seren im BHV-4-ELISA reagierten die fluoreszenzserologisch positiven Seren, mit einer Ausnahme (Nr. 19), ebenfalls positiv. Teilweise fielen die Befunde wenig deutlich aus; dies jedoch in Uebereinstimmung mit den standardmässig erhobenen Befunden (Tab. 1). Serum Nr. 5 musste in diesem Test als schwach positiv beurteilt werden. Wie zu erwarten war, reagierten die Seren Nr. 11 und 15 nicht nur mit BHV-1-Antigen, sondern auch mit BHV-4-Antigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mit den selbst hergestellten Antigenen erzielten ELISA-Ergebnisse mit den standardmässig erhobenen Befunden gut übereinstimmten. So reagierten BHV-4-positive Seren ungeachtet des Antikörper-Titers nur ausnahmsweise im BHV-1-ELISA und umgekehrt; bei den BHV-1- und CapHV-1-positiven Seren fand sich in Abhängigkeit vom homologen Antikörpertiter (Nettoextinktion) eine Reaktion im heterologen System. Bei den abweichenden Befunden bleibt abzuklären, ob sie auf eine verminderte Sensitivität oder aber auf eine erhöhte Spezifität der Standardmethoden zurückzuführen sind.

3.3. ELISA mit absorbierten Seren

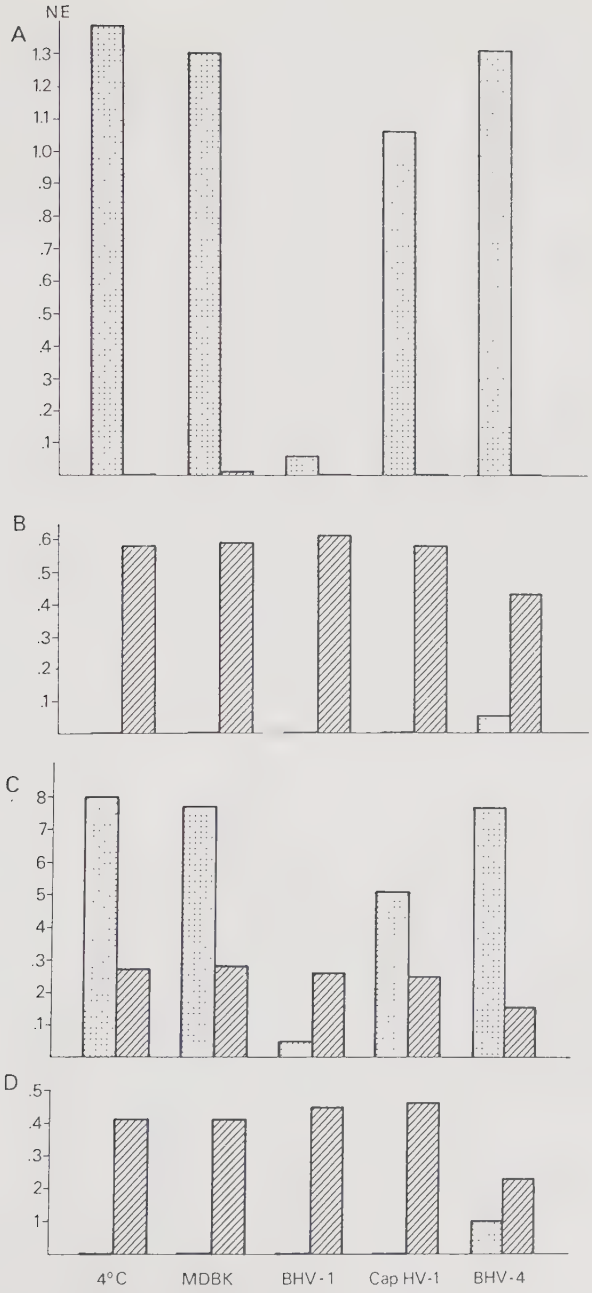
Einzelne Seren hatten sowohl mit BHV-1 als auch mit BHV-4 reagiert. Es blieb abzuklären, ob diese Befunde auf eine Doppelinfektion zurückzuführen sind oder als Ausdruck einer antigenen Verwandtschaft zu bewerten sind. Es wurden deshalb ELISA's mit absorbierten Seren durchgeführt (Abb. 2).

Nach Absorption des BHV-1-spezifischen Serums Nr. 5 mit BHV-1-infizierten Zellkulturen liess sich im BHV-1-ELISA (Abb. 2A) eine signifikante Antikörpertiter-Reduktion feststellen. Nach Absorption des gleichen Serums mit CapHV-1-infizierten Kulturen war ebenfalls eine deutliche Titerreduktion zu verzeichnen. Im Gegensatz hierzu hatte die Absorption mit BHV-4-infizierten Zellen keinen erkennbaren Einfluss auf den Antikörpertiter im BHV-1-ELISA. Im BHV-4-ELISA konnte mit diesem Serum, ungeachtet der Vorbehandlung, keine Reaktion festgestellt werden.

Führte man die gleichen Experimente mit Serum Nr. 14 durch (Abb. 2B) resultierte eine partielle Titerreduktion im BHV-4-ELISA nach vorgängiger Absorption mit BHV-4-infizierten Zellen. Es war weiter zu beobachten, dass das gleiche Serum ohne Absorption und nach Absorption mit BHV-1 oder CapHV-1 im BHV-1-ELISA regelmässig negativ, nach Absorption mit BHV-4 jedoch positiv reagierte. Gleiche Befunde ergaben sich mit dem Serum Nr. 16 (Abb. 2D).

Serum Nr. 15 hatte wiederholt sowohl mit BHV-1 als auch mit BHV-4 positiv reagiert (Tab. 1, Abb. 1). Abb. 2C macht deutlich, dass bei diesem Serum eine Antikörper-Titerreduktion im BHV-4-ELISA nur nach Absorption mit BHV-4 zu verzeichnen war. Beim gleichen Serum wurde im BHV-1-ELISA nach Absorption mit CapHV-1 eine deutliche und nach Absorption mit BHV-1 eine ausgeprägte Antikörper-Titerreduktion (Nettoextinktion) festgestellt. Es bleibt festzuhalten, dass die BHV-4-Antikörpertiter nach Absorption mit BHV-4, auch nach zusätzlichen Absorptionsschritten, nie eine so ausgeprägte Reduktion erfuhren, wie dies bei den BHV-1-Titern nach homologer Absorption der Fall war.

Abb. 2: ELISA mit absorbierten Seren
ELISA-Befunde bei den 4 Rinderseren Nr. 5, 14, 15 und 16 mit den Antigenen BHV-1 (punktiert) und BHV-4 (schraffiert): ohne Absorption (4°C) sowie nach Absorption mit BHV-1, CapHV-1, BHV-4 oder mock-infizierten Zellen (MDBK).
A: Serum Nr. 5
B: Serum Nr. 14
C: Serum Nr. 15
D: Serum Nr. 16
NE: Nettoextinktionswerte


A
NE
1.3
1.2
1.1
1.0
.9
.8
.7
.6
.5
.4
.3
.2
.1
B
.6
.5
.4
.3
.2
.1
C
8
7
6
5
4
3
2
1
D
.5
.4
.3
2
1
4°C
MDBK
BHV-1
Cap HV-1
BHV-4

Die beschriebenen Experimente zeigten, dass erregerspezifische Antikörper, ohne Beeinflussung des heterologen Reaktionsvermögens, zu eliminieren waren. 'BHV-4-spezifische' Seren reagierten indessen nach Absorption mit BHV-4 im BHV-1-ELISA regelmässig schwach positiv (Fig. 2B, D).

3.4. Radioimmunpräzipitation (RIP)

Die Beobachtung, dass die 'monospezifischen' BHV-4 Seren Nr. 14 und 16 (Abschnitt 3.3) nach Absorption mit dem homologen Virus im BHV-1-ELISA reproduzierbar positiv reagierten, war ein Hinweis auf die Existenz gewisser antigener Gemeinsamkeiten zwischen BHV-1 und BHV-4. Es wurde deshalb im Vergleich zum ELISA unter veränderten Bedingungen der Antigenpräsentation eine vergleichende RIP durchgeführt (Abb. 3 bis 5). Die mit den ELISA-Tests (Abb. 1) erzielten Befunde konnten grundsätzlich bestätigt werden, indem gerade die hochtitrigen BHV-1- und BHV-4-Seren nicht mit dem heterologen Antigen reagierten. Dagegen war die antigene Kreuzreaktion zwischen BHV-1 und CapHV-1 klar erkennbar.

Einige der im BHV-4-ELISA schwach positiven Seren (Nr. 11, 18, 20, 22, 23 und 24) ergaben mit Antigen von BHV-4 keine erkennbare Präzipitation. Dagegen reagierte mit diesem Antigen das bisher negativ befundene Serum Nr. 7 (Abb. 3). Eine deutliche Reaktion sowohl mit BHV-4 als auch mit BHV-1 zeigte nur das Serum Nr. 15 (Abb. 4). Bei BHV-4 wurden hauptsächlich die Proteine 140K, 135K, 123K und 120K präzipitiert. Daneben reagierten einzelne Seren zusätzlich mit den Proteinen 84K, 53K und 46/47K.

Seren, die mit BHV-1 reagierten, präzipitierten in Abhängigkeit vom homologen ELISA-Titer vor allem die Proteine mit der Bezeichnung 4, d, 7, 9/10, 11, 12, 17, 20/21 sowie 23, 24, 25, ℓ/26 und 27. Ein bisher BHV-1-negativ befundenes Serum (Nr. 19) reagierte reproduzierbar mit den Proteinen 7, 17, 23, 25. Die wiederholte Untersuchung dieses Serums mithilfe der BHV-1-Standardmethode sowie im SNT mit BHV-1 blieb indessen negativ.

Bei den Seren Nr. 5 bis 8 (Abb. 3) und 9 bis 13 (Abb. 4) zeigte sich die antigene Verwandtschaft zwischen BHV-1 und CapHV-1 deutlich. Das CapHV-1 spezifische Ziegenserum Nr. 13 präzipitierte zahlreiche Proteine des homologen Virusstammes (Abb. 4). Deren PAGE-Profil war jenem der BHV-1-spezifischen Präzipitate sehr ähnlich. Bei den BHV-1-positiven Seren ergaben sich ebenfalls ähnliche Präzipitationsmuster, ungeachtet, ob das homologe oder das heterologe Virusantigen eingesetzt wurde.

Abb. 3: SDS-PAGE-Profile der Radioimmunpräzipitate.
Die mit den Seren Nr. 1-8 erzielten Präzipitate der [^{35}S]Methionin markierten Antigene BHV-1 (A), CapHV-1 (B), BHV-4 (C) und Zellkontrolle (D) sind in den entsprechend bezeichneten Bahnen aufgetrennt. Für Vergleichszwecke wurde das jeweils eingesetzte, solubilisierte Antigen (Zell-Lysat: s) mitgeführt (BHV-1-Jura$_s$: J_s; CapHV-1-E.CH$_s$: E_s; BHV-4-LVR-140$_s$: L_s; MDBK-Kontrolle$_s$: K_s).

Die Nomenklatur der Proteine von BHV-1 und CapHV-1 lehnte sich an frühere Arbeiten (10,11) in denen die Proteine nach abnehmendem Molekulargewicht bezeichnet wurden. Bei den Proteinen von BHV-4 gab man deren relatives Molekulargewicht an (12).

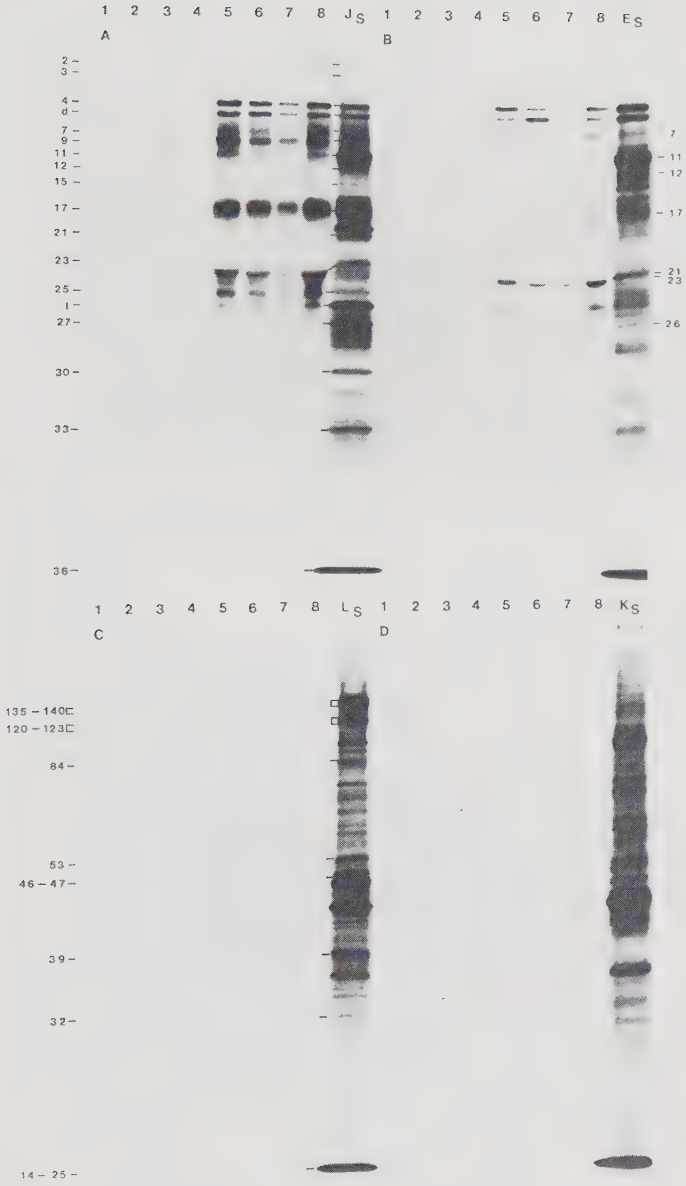

1 2 3 4 5 6 7 8 JS 1 2 3 4 5 6 7 8 ES
A
B
2 –
3 –
4 –
d –
7 –
9 –
11 –
12 –
15 –
17 –
21 –
23 –
25 –
I –
27 –
30 –
33 –
36 –
7
– 11
– 12
– 17
= 21
23
– 26
1 2 3 4 5 6 7 8 LS 1 2 3 4 5 6 7 8 KS
C
D
135 – 140
120 – 123
84 –
53 –
46 – 47 –
39 –
32 –
14 – 25 –

Abb. 4: SDS-PAGE-Profile der Radioimmunpräzipitate.
Die mit den Seren Nr. 9-16 erzielten Präzipitate der [^{35}S]Methionin markierten Antigene BHV-1 (A), CapHV-1 (B), BHV-4 (C) und Zellkontrolle (D) sind in den entsprechend bezeichneten Bahnen aufgetrennt. Für Vergleichszwecke wurde das jeweils eingesetzte, solubilisierte Antigen (Zell-Lysat: s) mitgeführt (BHV-1-Jura$_s$: J_s; CapHV-1-E.CH$_s$: E_s; BHV-4-LVR-140$_s$: L_s; MDBK-Kontrolle$_s$: K_s).

Die Nomenklatur der Proteine von BHV-1 und CapHV-1 lehnte sich an frühere Arbeiten (10,11) in denen die Proteine nach abnehmendem Molekulargewicht bezeichnet wurden. Bei den Proteinen von BHV-4 gab man deren relatives Molekulargewicht an (12).

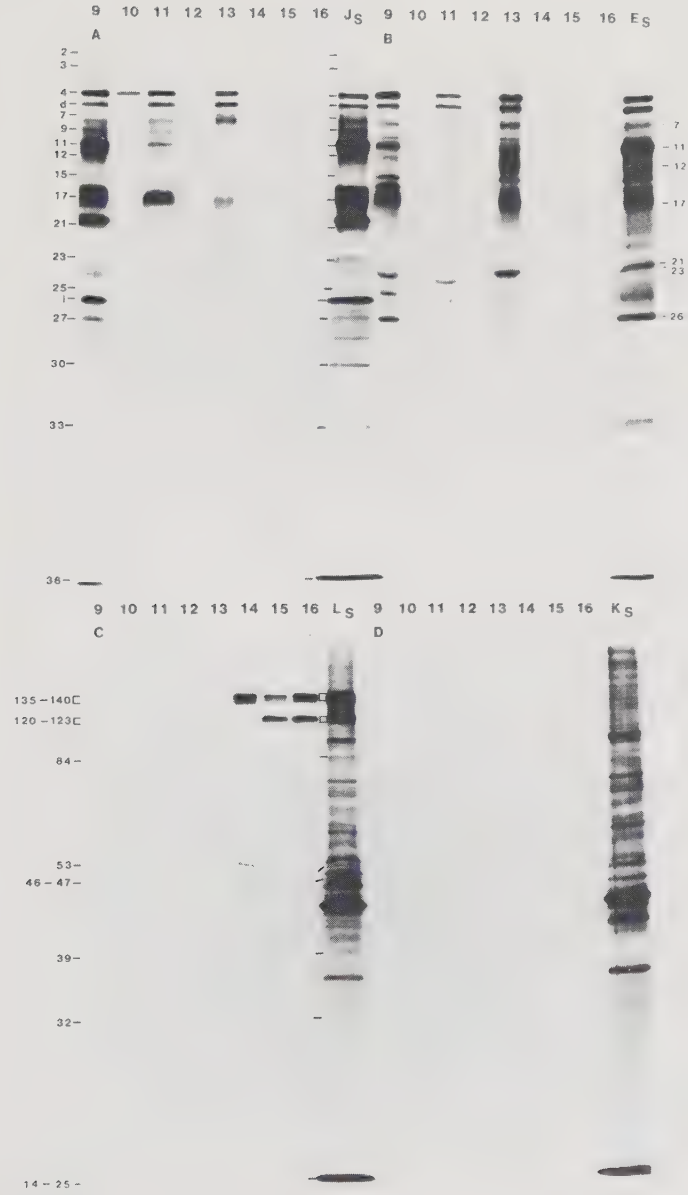
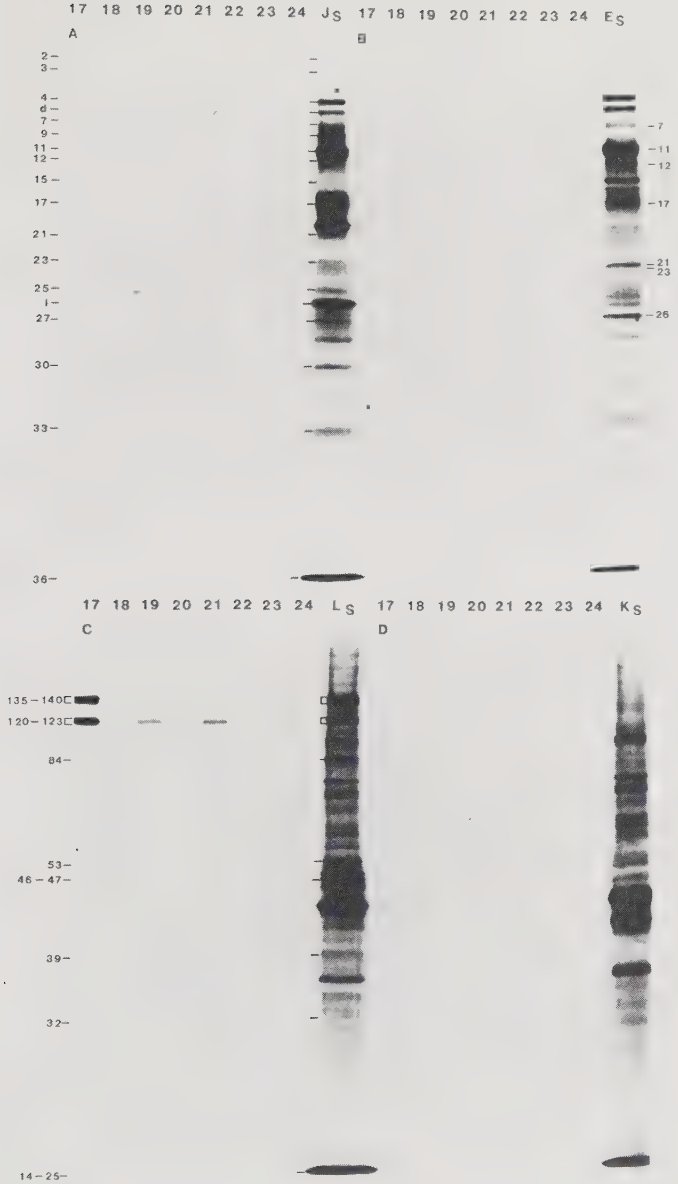

9 10 11 12 13 14 15 16 Js
A
9 10 11 12 13 14 15 16 Es
B
2
3
4
d
7
9
11
12
15
17
21
23
25
I
27
30
33
36
7
11
12
17
21
23
26
9 10 11 12 13 14 15 16 Ls
C
9 10 11 12 13 14 15 16 Ks
D
135 – 140C
120 – 123C
84
53
46 – 47
39
32
14 – 25

Abb. 5: SDS-PAGE-Profile der Radioimmunpräzipitate
Die mit den Seren Nr. 17-24 erzielten Präzipitate der [^{35}S]Methionin markierten Antigene BHV-1 (A), CapHV-1 (B), BHV-4 (C) und Zellkontrolle (D) sind in den entsprechend bezeichneten Bahnen aufgetrennt. Für Vergleichszwecke wurde das jeweils eingesetzte, solubilisierte Antigen (Zell-Lysat: s) mitgeführt (BHV-1-Jura$_s$: J_s; CapHV-1-E.CH$_s$: E_s; BHV-4-LVR-140$_s$: L_s; MDBK-Kontrolle$_s$: K_s).

Die Nomenklatur der Proteine von BHV-1 und CapHV-1 lehnte sich an frühere Arbeiten (10,11) in denen die Proteine nach abnehmendem Molekulargewicht bezeichnet wurden. Bei den Proteinen von BHV-4 gab man deren relatives Molekulargewicht an (12).


17 18 19 20 21 22 23 24 JS
A
17 18 19 20 21 22 23 24 ES
B
2–
3–
4–
d–
7–
9–
11–
12–
15–
17–
21–
23–
25–
I–
27–
30–
33–
36–
7
11
12
17
21
23
26
17 18 19 20 21 22 23 24 LS
C
17 18 19 20 21 22 23 24 KS
D
135–140
120–123
84–
53–
46–47–
39–
32–
14–25–

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, ob mit den in unserem Land durchgeführten Massnahmen zur Bekämpfung der IBR/IPV nicht nur BHV-1 positive Tiere sondern auch solche nach Infektion mit BHV-4 erfasst werden. Mohanty et al. (14) stellten nämlich fest, dass BHV-1 und BHV-4 im ELISA deutlich kreuzreagieren. Die vorliegenden Befunde zeigen, dass zwischen BHV-1 und BHV-4 gewisse antigene Gemeinsamkeiten bestehen. Diese manifestieren sich indessen im ELISA-Test, wie er zur Erfassung der BHV-1 Reagenten praktiziert wird, nicht. Andere Autoren (3), die mit demselben BHV-4 Stamm (DN599) wie Mohanty et al. (14) gearbeitet hatten, konnten im konventionell durchgeführten ELISA ebenfalls keine antigene Wechselwirkung zwischen den beiden Virusgruppen nachweisen.

Das Vorkommen gemeinsamer Antigene bei verschiedenen Virusgruppen und Virustypen, insbesondere auch bei Rinderherpesviren, ist sowohl von diagnostischem als auch von pathogenetischem und immunologischem Interesse. Da BHV-4 spezifische Seren kaum virusneutralisierende Eigenschaften aufweisen (17,20), konnte für den weitergehenden Antigenvergleich die Kreuzneutralisation nicht verwendet werden. Neben der Immunfluoreszenz kamen deshalb der ELISA und die Radioimmunpräzipitation zur Anwendung.

Bei der Antigenaufbereitung für die ELISA-Tests mit BHV-1, BHV-4 und CapHV-1 wurde berücksichtigt, dass beim Antigenvergleich nicht ausschliesslich Virion-Proteine, sondern auch Nicht-Strukturproteine erfasst werden sollten. Für die vorliegende Arbeit wurde deshalb auf eine Virusreinigung bewusst verzichtet. Aus Tab. 1 und Fig. [illegible] lässt sich entnehmen, dass die serologischen Befunde vergleichbar ausfielen, wenn die Standardmethoden

(Trachitest^{R} für BHV-1 und IFT für BHV-4) oder die selbst hergestellten ELISA-Antigene für den Antikörpernachweis eingesetzt wurden. Vereinzelt ergaben sich Probleme bei der Beurteilung niedrig-titriger Seren, indem die Befunde nicht regelmässig reproduzierbar waren. Dies überrascht nicht, da jene Seren bereits mit den Standardmethoden als schwach positiv beurteilt worden waren. So waren 12 Seren fluoreszenzserologisch BHV-4-positiv. Im BHV-4-ELISA (Fig. 1) reagierten noch deren 10, sowie eine zusätzliche Probe (Serum Nr. 5) positiv. In der RIP reagierten noch sechs und ein weiteres Serum (Nr. 7) mit BHV-4. Diese Feststellungen machen deutlich, dass sich im Zweifelsfall die Anwendung zusätzlicher Testmethoden lohnt. Am Beispiel von Serum Nr. 19, das in der RIP mit BHV-1 regelmässig positiv, im ELISA und im SNT jedoch durchwegs negativ reagierte, zeigte sich jedoch, dass weitere Untersuchungen zur Klärung dieses Phänomens nötig sind.

Aus den vergleichenden ELISA- (Abb. 1) und RIP- (Abb. 3 bis 5) Ergebnissen ergaben sich keine zwingenden Hinweise auf antigene Gemeinsamkeiten zwischen BHV-1 und BHV-4, da verschiedene hochtitrige Seren (Tab. 1, Abb. 1) nur mit BHV-1 oder BHV-4 reagierten. Bei zwei Seren (Nr. 11 und 15) konnte im ELISA mithilfe absorbierter Seren gezeigt werden, dass die Reaktion mit beiden Antigenen auf eine Doppelinfektion zurückzuführen ist.

Dass zwischen BHV-1 und BHV-4 dennoch eine antigene Verwandschaft besteht, ergab sich aus vergleichenden ELISA-Befunden mit den absorbierten Seren Nr. 14 und 16 (Abb. 2). Das Ausmass dieser Verwandtschaft ist vermutlich nur gering. Auch Levings et al. (7) fanden indirekte Hinweise auf eine Kreuzreaktion zwischen BHV-1 und BHV-4. Mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese stellten sie einerseits fest, dass BHV-1 Antigen oder BHV-1 spezifische Seren im heterologen System (mit BHV-4 Serum, respektive

BHV-4 Antigen) keine Präzipitate ergaben. Durch Zugabe von BHV-4 Antigen zum BHV-1-Antigen oder BHV-4 Serum zum BHV-1-Serum konnte andererseits beobachtet werden, dass die Präzipitation von vier BHV-1 Antigenen eine quantitative Veränderung erfuhr. Es lässt sich nicht eindeutig erklären, warum in den vorliegenden Versuchen die antigene Kreuzreaktion zwischen BHV-1 und BHV-4 ebenfalls nur indirekt zu zeigen war. Eine Möglichkeit der Erklärung bestünde darin, dass die Lokalisation oder Zahl der kreuzreaktiven Antikörper-Bindungsstellen bei den beiden Viren unterschiedlich ist. Daneben muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass die entsprechenden Befunde nicht mit jedem Serum zu erheben waren, da deren Antikörperspektrum vermutlich gegen verschiedene antigene Determinanten gerichtet war. Bei einem Vergleich der Antigene verschiedener Viren sind demnach nicht nur die verwendeten Seren, sondern auch die Antigenpräparation sowie die Empfindlichkeit der verwendeten Testsysteme von Bedeutung. Ein definitiver Einblick in das Ausmass der bestehenden Homologie zwischen BHV-1 und BHV-4 dürfte von Nukleinsäure-Hybridisationen und Nukleotidsequenz-Analysen erwartet werden.

Das CapHV-1 war wegen seiner bekannten immunologischen Verwandtschaft mit BHV-1 (4,8,9) in die Untersuchungen miteinbezogen worden. Im Gegensatz zu BHV-4 war die antigene Gemeinsamkeit mit BHV-1 in allen durchgeführten Tests offenkundig. In der RIP (Abb. 4) war zudem aufgefallen, dass sich die Proteinmuster von BHV-1 und CapHV-1 ähnlich waren, und dass die meisten Proteine durch heterologes Serum präzipitiert wurden. Die vorliegenden Befunde zeigen, dass BHV-1 und CapHV-1 ähnlich aufgebaut sind, obwohl sie sich in Bezug auf das Wirtsspektrum deutlich unterscheiden (1,8). Um dieses Verhalten zu erklären, bedarf es weitergehender Untersuchungen auf molekularer Basis.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die durch das Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) verursachte IBR/IPV wird in der Schweiz durch Ausmerzung seropositiver Rinder bekämpft. Diese werden mithilfe eines im ganzen Land einheitlich durchgeführten indirekten ELISA erfasst. Laut Angaben in der Literatur reagieren Tiere nach Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus 4 (BHV-4) im ELISA mit BHV-1-Antigen. Wir klärten ab, ob die IBR/IPV-Serodiagnostik durch Infektionen mit BHV-4 beeinträchtigt wird. Es wurden Antigene von BHV-1 und BHV-4 unter vergleichbaren Bedingungen hergestellt und mit ausgewählten Seren im ELISA und in der Radioimmunpräzipitation (RIP) untersucht. Das Caprine Herpesvirus 1 (CapHV-1), dessen antigene Verwandtschaft mit BHV-1 bekannt ist, wurde zu Vergleichszwecken miteinbezogen. BHV-4-positive Seren reagierten nur ausnahmsweise mit BHV-1-Antigen und umgekehrt. Soweit solche Kreuzreaktionen auftraten, wurde durch Absorption mit virusinfizierten Zellen (BHV-1 bzw. BHV-4) eine selektive Reduktion der erregerspezifischen Antikörper erzielt. Dies lässt auf eine Doppelinfektion der betreffenden Rinder schliessen. Nach Absorption mit BHV-4-infizierten Zellen reagierten BHV-4-positive Seren im BHV-1-ELISA regelmässig schwach positiv. Dies ist ein indirekter Hinweis auf das Bestehen geringgradiger antigener Gemeinsamkeiten zwischen BHV-1 und BHV-4. Die IBR/IPV-Diagnostik wurde hierdurch jedoch nicht beeinträchtigt. Das CapHV-1 zeigte im Gegensatz zu BHV-4 eine ausgeprägte Verwandtschaft mit BHV-1. Dies konnte sowohl im ELISA als auch in der RIP gezeigt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Berrios P.E., McKercher D.G., Knight H.D.: Pathogenicity of a caprine herpesvirus. Am. J. Vet. Res. 36, 1763-1769 (1975).

2. Bommeli W.R., Kihm U., Lazarowicz M., Steck F.: Rapid detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus by micro enzyme linked immunosorbent assay (MICRO ELISA). Proc. 2nd International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Lucerne (CH), Vol. II pp. 235-239 (June 25, 1980).

3. Edwards S., Newman R.H.: Detection of antibodies to bovid herpesvirus 4 by ELISA. Vet. Microbiol. 10, 149-154 (1984/85).

4. Engels M., Gelderblom H., Darai G., Ludwig H.: Goat herpesviruses: Biological and physiochemical properties. J. gen. Virol. 64, 2237-2247 (1983).

5. Engels M., Metzler A.E., Wyler R.: Ein Virus sucht seine Krankheit: Seroepizootologische Untersuchungen über das Vorkommen der Bovinen Herpes Mamillitis in der Schweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk. 121, 565-576 (1979).

6. Gibbs E.P.J., Rweyemamu M.M.: Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesvirus 2 and 3. Vet. Bull. 47, 411-425 (1977).

7. Levings R.L., Kaeberle M.L., Reed D.E.: Cross-reactions of bovine herpesvirus 1 antigens with those of other cattle herpesviruses. Vet. Microbiol. 9, 329-344 (1984).

8. Ludwig H.: Bovine herpesviruses. In: Roizman B. (ed), The Herpesviruses, vol. 2, pp. 135-214. New-York-London: Plenum Press 1983.

9. Mettler F., Engels M., Wild P., Bivetti A.: Herpesvirus-Infektion bei Zicklein in der Schweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk. 121, 655-662 (1979).

10. Metzler, A.E., Matile H., Gassmann U., Engels M., Wyler R.: European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. Arch. Virol. 85, 57-69 (1985).

11. Metzler A.E., Schudel A.A., Engels M.: Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. Arch. Virol. 87, 205-217 (1986).

12. Metzler A.E., Wyler R.: Polypeptids and antigens of bovine herpesvirus 4 (BHV-4). J. gen. Virol. (eingereicht).

13. Mohanty S.B., Hammond R.C., Lillie M.G.: A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. Arch. ges. Virusforsch. 34, 394-395 (1971).

14. Mohanty S.B., Rockemann D.D., Snyder D.B.: Serologic cross-reaction between bovine herpesvirus 1 and 4 by the enzyme linked immunosorbent assay. Microbiologica 7, 179-186 (1984).

15. Müller R., Engels M., Metzler A.E., Boller H., Wyler R.: Der erste abgeklärte Fall von boviner Herpesmamillitis in der Schweiz. Tierärztl. Prax. 12, 297-305 (1984).

16. Osorio F.A., Reed D.E., Van der Maaten M.J., Metz C.A.: Comparison of the endonuclease analysis and serological analysis. Am. J. vet. Res. 46, 2104-2109 (1985).

17. Potgieter L.N.D., Maré C.J.: Assay and antigenic interrelationship of the recently isolated bovine herpesviruses, DN 599, FTC and V 11. Arch. ges. Virusforsch. 46, 238-247 (1974).

18. Probst K., Wyler R., Kihm U., Ackermann M., Bruckner L., Müller H.K., Ehrensperger F.: Zur IBR-Virusausscheidung experimentell infizierter Kühe insbesondere in der Milch. Schweiz. Arch. Tierheilk. 127, 723-733 (1985).

19. Sterz H., Ludwig H., Rott R.: Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mamillitis virus. Intervirology 2, 1-13 (1973/74).

20. Storz J., Ehlers B., Todd W.J., Ludwig H.: Bovine cytomegaloviruses: Identification and differential properties. J. gen. Virol. 65, 697-706 (1984).

21. Stuker G., Haab P., Giger T.: Nachweis von IBR/IPV-Antikörpern aus der Milch. Schweiz. Arch. Tierheilk. 122, 707-710 (1980).

22. Van Drunen Littel-van den Hurk S., Van den Hurk J.V., Gilchrist J.E., Vikram M., Babiuk L.A.: Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: Characterization of their biochemical and immunological properties. Virol. 135, 466-479 (1984).

23. Waldvogel A., Engels M., Wild P., Stünzi H., Wyler R.: Caprine herpesvirus infection in Switzerland : Some aspects of its pathogenicity. Zbl. Vet. Med. B., 28, 612-623 (1981).

24. Wellemans G., Antoine H., Broes A., Charlier G., Van Opdenbosch E.: Isolement d'un virus herpès chez des bovins atteints de métrite post-partum. Ann. Méd. Vét. 127, 481-482 (1983).

7. VERDANKUNGEN

Ganz herzlichen Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, besonders

- Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Ueberlassung des Themas und das Referat.

- Herrn Prof. Dr. Bertschinger für die Durchsicht des Manuskripts und das Korreferat.

- Herrn Dr. A.E. Metzler für die Leitung der Arbeit.

- Herrn Beat Scheier für die zuverlässige Bereitstellung der Zellen und die technische Mitarbeit.

- Frau Jacqueline Diener für die speditive und verständnisvolle Reinschrift des Manuskripts.

- Frau Anita Hug für fotografische und Herrn F. Ackermann für grafische Arbeiten.

8. LEBENSAUF

Erika Sanvittore-Zimmermann, geboren am 29. Juli 1950 in Zürich.

Besuch der Primar- und Sekundarschule in Zürich. Ausübung meines Berufes als Anwaltssekretärin bis 1976.

1979	eidg. Maturitätsprüfung, Typus E.
1979 - 1984	Studium und Staatsexamen an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich.

Von Januar 1985 bis März 1986 Assistentin am Institut für Virologie der Universität Zürich (Prof. Dr. R. Wyler).